

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

JC658 U.S. PTO
09/715035
11/20/00

In re PATENT APPLICATION of
Inventor(s): MÖCKEL et al.

Appln. No.: 09
Series ↑ | ↑ Serial No.

Group Art Unit: Not Yet Assigned

Filed: November 21, 2000

Examiner: Not Yet Assigned

Title: NOVEL NUCLEOTIDE SEQUENCES ENCODING THE
PFKA GENE

Atty. Dkt. PM 274441

990169BT-
pat/SW

M#

Client Ref

Date: November 20, 2000

**SUBMISSION OF PRIORITY
DOCUMENT IN ACCORDANCE
WITH THE REQUIREMENTS OF RULE 55**

Hon. Asst Commissioner of Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

Please accept the enclosed certified copy(ies) of the respective foreign application(s) listed below for which benefit under 35 U.S.C. 119/365 has been previously claimed in the subject application and if not is hereby claimed.

<u>Application No.</u>	<u>Country of Origin</u>	<u>Filed</u>
100 11 922.0	GERMANY	11 March 2000

Respectfully submitted,

Pillsbury Madison & Sutro LLP
Intellectual Property Group

1100 New York Avenue, NW
Ninth Floor
Washington, DC 20005-3918
Tel: (202) 861-3000
Atty/Sec: ASH/JRH

<u>By Atty:</u>	<u>Ann S. Hobbs</u>	<u>Reg. No.</u>	<u>36830</u>
<u>Sig:</u>	<u>C. A. Hobbs</u>	<u>Fax:</u>	<u>(202) 822-0944</u>
		<u>Tel:</u>	<u>(202) 861-3063</u>

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



JC658 U.S. PTO
09/715035
11/20/00

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 11 922.0

Anmeldetag: 11. März 2000

Anmelder/Inhaber: Degussa-Hüls Aktiengesellschaft, Frankfurt
am Main/DE

Bezeichnung: Neue für das pfkA-Gen codierende Nukleotidse-
quenzen

Priorität: 23.11.1999 DE 199 56 133.8

IPC: C 07 H, C 12 N, C 12 P

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 26. September 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Dzierzon

Neue für das pfkA-Gen codierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das pfkA-Gen kodierende Nukleotidsequenzen und Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, unter

5 Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen das pfkA-Gen verstärkt wird.

Stand der Technik

Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, insbesondere aber in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der

15 Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie z. B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z. B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch

20 z. B. Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z. B. das Lysin-Analogon S-(2-Aminoethyl)-Cystein oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und L-Aminosäuren wie z. B. L-Lysin produzieren.

30 Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung Aminosäure produzierender Stämme von Corynebacterium eingesetzt, indem

man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht. Übersichtsartikel hierzu findet man unter anderem bei Kinoshita ("Glutamic Acid Bacteria", in: *Biology of Industrial Microorganisms*, Demain and Solomon (Eds.), Benjamin Cummings, London, UK, 1985, 115-142), Hilliger (BioTec 2, 40-44 (1991)), Eggeling (Amino Acids 6:261-272 (1994)), Jetten und Sinskey (Critical Reviews in Biotechnology 15, 73-103 (1995)) und Sahm et al. (Annals 5 of the New York Academy of Science 782, 25-39 (1996)).
10

15

20

25

Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, bereitzustellen.

5 Beschreibung der Erfindung

Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin, in der pharmazeutischen Industrie und insbesondere in der Tierernährung Anwendung. Es besteht daher ein allgemeines Interesse daran, neue verbesserte Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, bereitzustellen.

Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Base, sondern auch die Salze wie z. B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

15 Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das

20 die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,

25 c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c).

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind

ein Polynukleotid gemäß Anspruch 4, enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt,

ein Polynukleotid gemäß Anspruch 6, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält

ein Vektor, enthaltend das Polynukleotid gemäß Anspruch 1, insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor

und als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die den Vektor enthalten.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die

erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank, die das vollständige Gen mit der Polynukleotidsequenz entsprechend SEQ ID No. 1 enthalten, mit einer Sonde, die die Sequenz des genannten Polynukleotids gemäß SEQ ID No. 1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten DNA-Sequenz.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um cDNA in voller Länge zu isolieren, die für Phosphofructokinase codieren und solche cDNA oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der des Phosphofructokinase-Gens aufweisen.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind weiterhin geeignet als Primer zur Herstellung von DNA von Genen, die für Phosphofructokinase codieren, durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität der Phosphofructokinase und auch solche ein, die zu wenigstens 70 % identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders die zu wenigstens 90 % bis 95 % Identität mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits eine Aminosäure produzieren, und in 5 denen die für das pfkA-Gen codierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die 10 entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

15 Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer 20 Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

25 Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum*, sind die zum Beispiel bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806

30 *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870

Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539

Corynebacterium melassecola ATCC17965

Brevibacterium flavum ATCC14067

Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

und daraus hergestellte L-Lysin produzierende Mutanten bzw.
Stämme, wie beispielsweise

5 Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709
 Brevibacterium flavum FERM-P 1708
 Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712
 Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463
 Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464 und
10 Corynebacterium glutamicum DSM5715.

Den Erfindern gelang es, das neue, für das Enzym
Phosphofructokinase (EC 2.7.1.11) kodierende pfkA-Gen von
C. glutamicum zu isolieren.

Zur Isolierung des pfkA-Gens oder auch anderer Gene von C.
15 glutamicum wird zunächst eine Genbank dieses
 Mikroorganismus in E. coli angelegt. Das Anlegen von
 Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und
 Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das
 Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in
20 die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland,
 1990) oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular
 Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory
 Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die
 des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell
25 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et
 al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996)
 beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032, die
 mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987,
 Proceedings of the National Academy of Sciences USA,
30 84:2160-2164) im E. coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al.,
 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.
 Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326
 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von C. glutamicum
 ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pHC79 (Hohn und

Collins, Gene 11, 291-298 (1980)). Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirt eignen sich besonders solche *E. coli*-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 α mcr, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z. B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Auf diese Weise wurde die neue für das Gen *pfkA* kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID NO 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID NO 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des *pfkA*-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID NO 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID NO 1 oder Teilen von SEQ ID NO 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z. B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d. h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar

stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID NO 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

10 In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID NO 1 oder Teilen von SEQ ID NO 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich 15 aus SEQ ID NO 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter 20 Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 25 findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: a practical approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

30 Die Erfinder fanden heraus, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des pfkA-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, produzieren.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die

Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare

5 Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Lysin-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls
10 die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Génkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der
15 Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns
20 et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift EPS 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of
25 Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides
30 (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Beispielhaft wurde das erfindungsgemäße pfkA-Gen mit Hilfe von Plasmiden überexprimiert.

Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen
35 Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte

Plasmidvektoren wie z. B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHs2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den 5 kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGAl. Andere Plasmidvektoren wie z. B. solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet 10 werden.

Weiterhin eignen sich solche Plasmidvektoren mit Hilfe 15 derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige 20 Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 25 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678- 30 84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) oder pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen 35 enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362

(1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der 5 resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Zusätzlich kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin vorteilhaft sein, neben dem pfkA-Gen eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, 10 der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus oder des Aminosäure-Exports zu verstärken oder zu überexprimieren.

So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Lysin gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus 15 der Gruppe

- das für die Dihydripicolinat-Synthase kodierende dapA-Gen (EP-B 0 197 335), oder
- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende gap-Gen (Eikmanns (1992), Journal of 20 Bacteriology 174:6076-6086), oder
- das für die Triosephosphat Isomerase codierende tpi-Gen (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086), oder
- das für die 3-Phosphoglycerat Kinase codierende pgk-Gen (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086), oder
- das für die Pyruvat Carboxylase codierende pyc-Gen (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086), oder
- 30 • das für den Lysin-Export kodierende lysE-Gen (DE-A-195 48 222)

überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, neben dem *pfkA*-Gen gleichzeitig

- 5 • das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase codierende *pck*-Gen (DE 199 50 409.1 DSM 13047) und/oder
- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende *pgi*-Gen (US 09/396,478, DSM 12969)

abzuschwächen.

- 10 Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, neben der Überexpression des *pfkA*-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products, 15 Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder 20 repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik 25 (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen 30 von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA,

1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z. B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und 5 Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff 10 haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die 15 Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten 20 wie z. B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die 25 genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. 30 Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z. B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem 35 Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z. B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen

aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff-haltige Gasmischungen wie z. B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die 5 Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an Lysin gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Analyse von L-Lysin kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender 10 Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin.

Das pfkA-Gen findet sich hinterlegt in dem Stamm DSM 5715 15 unter der Bezeichnung DSM 5715/pT-pfkAexp, registriert unter der DSM 13253.

Beispiele

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

5 Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Chromosomal DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179)

10 beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem 25 Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC 13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt. Zur Infektion

des *E. coli* Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der 5 Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C 10 wurden rekombinante Einzelklone selektiert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des pfkA-Gens

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep 15 Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit 20 shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp 25 mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany). Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym 30 BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring

Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den *E. coli* Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, 5 Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 μ g/ml Zeocin ausplattiert. Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit 10 dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic 15 Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF 20 Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter 25 Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZero1-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden, 30 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt. Weitere Analysen wurden mit den "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research, 25:3389-3402), gegen die non-redundant Datenbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, MD, 35 USA) durchgeführt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID NO 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 1029 Basenpaaren, welches als pfkA-Gen bezeichnet wurde. Das pfkA-Gen kodiert für ein Protein von 343 Aminosäuren.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG

5 <120> Neue für das pfkA-Gen codierende Nukleotidsequenzen

<130> 990169 BT

<140>

10 <141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

15 <210> 1

<211> 1274

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

20 <220>

<221> CDS

<222> (143)..(1171)

25 <400> 1

gtcgatttgt taatgaaact gcagctctgg cgattaaata agatggtcag agacagttt 60

ttggcctgtc aaccctgtg attctcttat ttttgggtga ttgttccggc gcgggtgtt 120

30 tcatgggttt aatatggaag ac atg cga att gct act ctc acg tca ggc ggc 172
Met Arg Ile Ala Thr Leu Thr Ser Gly Gly
1 5 1035 gac tgc ccc gga cta aac gcc gtc atc cga gga atc gtc cgc aca gcc 220
Asp Cys Pro Gly Leu Asn Ala Val Ile Arg Gly Ile Val Arg Thr Ala
15 20 2540 agc aat gaa ttt ggc tcc acc gtc gtt ggt tat caa gac ggt tgg gaa 268
Ser Asn Glu Phe Gly Ser Thr Val Val Gly Tyr Gln Asp Gly Trp Glu
30 35 4045 gga ctg tta ggc gat cgt cgc gta cag ctg tat gac gat gaa gat att 316
Gly Leu Leu Gly Asp Arg Val Gln Leu Tyr Asp Asp Glu Asp Ile
45 50 5550 gac cga atc ctc ctt cga ggc acc att ttg ggc act ggt cgc ctc 364
Asp Arg Ile Leu Leu Arg Gly Thr Ile Leu Gly Thr Arg Leu
60 65 7055 cat ccg gac aag ttt aag gcc gga att gat cag att aag gcc aac tta 412
His Pro Asp Lys Phe Lys Ala Gly Ile Asp Gln Ile Lys Ala Asn Leu
75 80 85 9055 gaa gac gcc ggc atc gat gcc ctt atc cca atc ggt ggc gaa gga acc 460
Glu Asp Ala Gly Ile Asp Ala Leu Ile Pro Ile Gly Gly Glu Gly Thr
95 100 105

	ctg aag ggt gcc aag tgg ctg tct gat aac ggt atc cct gtt gtc ggt	508
	Leu Lys Gly Ala Lys Trp Leu Ser Asp Asn Gly Ile Pro Val Val Gly	
	110 115 120	
5	gtc cca aag acc att gac aat gac gtg aat ggc act gac ttc acc ttc	556
	Val Pro Lys Thr Ile Asp Asn Asp Val Asn Gly Thr Asp Phe Thr Phe	
	125 130 135	
10	ggt ttc gat act gct gtg gca gtg gct acc gac gct gtt gac cgc ctg	604
	Gly Phe Asp Thr Ala Val Ala Val Ala Thr Asp Ala Val Asp Arg Leu	
	140 145 150	
15	cac acc acc gct gaa tct cac aac cgt gtg atg atc gtg gag gtc atg	652
	His Thr Thr Ala Glu Ser His Asn Arg Val Met Ile Val Glu Val Met	
	155 160 165 170	
20	ggc cgc cac gtg ggt tgg att gct ctg cac gca ggt atg gcc ggc ggt	700
	Gly Arg His Val Gly Trp Ile Ala Leu His Ala Gly Met Ala Gly Gly	
	175 180 185	
25	gct cac tac acc gtt att cca gaa gta cct ttc gat att gca gag atc	748
	Ala His Tyr Thr Val Ile Pro Glu Val Pro Phe Asp Ile Ala Glu Ile	
	190 195 200	
30	tgc aag gcg atg gaa cgt cgc ttc cag atg ggc gag aag tac ggc att	796
	Cys Lys Ala Met Glu Arg Arg Phe Gln Met Gly Glu Lys Tyr Gly Ile	
	205 210 215	
35	atc gtc gtt gcg gaa ggt gcg ttg cca cgc gaa ggc acc atg gag ctt	844
	Ile Val Val Ala Glu Gly Ala Leu Pro Arg Glu Gly Thr Met Glu Leu	
	220 225 230	
40	cgt gaa ggc cac att gac cag ttc ggt cac aag acc ttc acg gga att	892
	Arg Glu Gly His Ile Asp Gln Phe Gly His Lys Thr Phe Thr Gly Ile	
	235 240 245 250	
45	gga cag cag atc gct gat gag atc cac gtg cgc ctc ggc cac gat gtt	940
	Gly Gln Gln Ile Ala Asp Glu Ile His Val Arg Leu Gly His Asp Val	
	255 260 265	
50	cgt acg acc gtt ctt ggc cac att caa cgt ggt gga acc cca act gct	988
	Arg Thr Thr Val Leu Gly His Ile Gln Arg Gly Gly Thr Pro Thr Ala	
	270 275 280	
55	ttc gac cgt gtt ctg gcc act cgt tat ggt gtt cgt gca gct cgt gcg	1036
	Phe Asp Arg Val Leu Ala Thr Arg Tyr Gly Val Arg Ala Ala Arg Ala	
	285 290 295	
50	tgc cat gag gga agc ttt gac aag gtt gtt gct ttg aag ggt gag agc	1084
	Cys His Glu Gly Ser Phe Asp Lys Val Val Ala Leu Lys Gly Glu Ser	
	300 305 310	
55	att gag atg atc acc ttt gaa gaa gca gtc gga acc ttg aag gaa gtt	1132
	Ile Glu Met Ile Thr Phe Glu Glu Ala Val Gly Thr Leu Lys Glu Val	
	315 320 325 330	

cca ttc gaa cgc tgg gtt act gcc cag gca atg ttt gga tagttttcg 1181
 Pro Phe Glu Arg Trp Val Thr Ala Gln Ala Met Phe Gly
 335 340

5 ggctttatc aacagccaat aacagctctt tcgcccattg aggtggaggg gctgttttt 1241
 catgccgtaa ggaaaagtgc a agtaagtgaa atc 1274

10 <210> 2
 <211> 343
 <212> PRT
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

15 <400> 2
 Met Arg Ile Ala Thr Leu Thr Ser Gly Gly Asp Cys Pro Gly Leu Asn
 1 5 10 15

20 Ala Val Ile Arg Gly Ile Val Arg Thr Ala Ser Asn Glu Phe Gly Ser
 20 25 30

Thr Val Val Gly Tyr Gln Asp Gly Trp Glu Gly Leu Leu Gly Asp Arg
 35 40 45

25 Arg Val Gln Leu Tyr Asp Asp Glu Asp Ile Asp Arg Ile Leu Leu Arg
 50 55 60

30 Gly Gly Thr Ile Leu Gly Thr Gly Arg Leu His Pro Asp Lys Phe Lys
 65 70 75 80

Ala Gly Ile Asp Gln Ile Lys Ala Asn Leu Glu Asp Ala Gly Ile Asp
 85 90 95

35 Ala Leu Ile Pro Ile Gly Gly Glu Gly Thr Leu Lys Gly Ala Lys Trp
 100 105 110

Leu Ser Asp Asn Gly Ile Pro Val Val Gly Val Pro Lys Thr Ile Asp
 115 120 125

40 Asn Asp Val Asn Gly Thr Asp Phe Thr Phe Gly Phe Asp Thr Ala Val
 130 135 140

Ala Val Ala Thr Asp Ala Val Asp Arg Leu His Thr Thr Ala Glu Ser
 45 145 150 155 160

His Asn Arg Val Met Ile Val Glu Val Met Gly Arg His Val Gly Trp
 165 170 175

50 Ile Ala Leu His Ala Gly Met Ala Gly Gly Ala His Tyr Thr Val Ile
 180 185 190

Pro Glu Val Pro Phe Asp Ile Ala Glu Ile Cys Lys Ala Met Glu Arg
 195 200 205

55 Arg Phe Gln Met Gly Glu Lys Tyr Gly Ile Ile Val Val Ala Glu Gly
 210 215 220

Ala Leu Pro Arg Glu Gly Thr Met Glu Leu Arg Glu Gly His Ile Asp
225 230 235 240

5 Gln Phe Gly His Lys Thr Phe Thr Gly Ile Gly Gln Gln Ile Ala Asp
245 250 255

Glu Ile His Val Arg Leu Gly His Asp Val Arg Thr Thr Val Leu Gly
260 265 270

10 His Ile Gln Arg Gly Gly Thr Pro Thr Ala Phe Asp Arg Val Leu Ala
275 280 285

15 Thr Arg Tyr Gly Val Arg Ala Ala Arg Ala Cys His Glu Gly Ser Phe
290 295 300

Asp Lys Val Val Ala Leu Lys Gly Glu Ser Ile Glu Met Ile Thr Phe
305 310 315 320

20 Glu Glu Ala Val Gly Thr Leu Lys Glu Val Pro Phe Glu Arg Trp Val
325 330 335

Thr Ala Gln Ala Met Phe Gly
340

25

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
 - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70 % identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
 - 15 c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
 - e) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Basen der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c).
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, 20 wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, 25 enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
 - 30 (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz
 - (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
 - (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

5 6. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz 10 in SEQ ID No. 2 darstellt, enthält.

10 7. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, durch gekennzeichnet, daß man folgende Schritte durchführt:

15 a) Fermentation der die L-Aminosäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man zumindest das pfkA-Gen oder dafür codierende Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert.

20 b) Anreicherung von der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien und

25 c) Isolieren von der L-Aminosäure.

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, durch gekennzeichnet, daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.

30 9. Verfahren gemäß Anspruch 7, durch gekennzeichnet, daß man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung des L-Lysins verringern.

10. Verfahren gemäß Anspruch 7,
durch gekennzeichnet,
daß man einen mit einem Plasmidvektor transformierten
Stamm einsetzt, und der Plasmidvektor die für das
5 pfkA-Gen codierende Nukleotidsequenz trägt.
11. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 7
bis 10,
durch gekennzeichnet,
daß man coryneforme Bakterien verwendet, die L-Lysin
10 herstellen.
12. Verfahren gemäß Anspruch 6,
durch gekennzeichnet,
daß man für die Herstellung von Lysin Bakterien
fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder
15 mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 12.1 das für die Dihydripicolinat-Synthase
kodierende dapA-Gen,
- 12.2 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-
Gen,
- 20 12.3 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende
tpi-Gen,
- 12.4 das Gen für die Succinyldiaminopimelat-
Desuccinylase kodierende dapE-Gen,
- 25 12.5 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat
Dehydrogenase kodierende gap-Gen,
- 12.6 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende
pgk-Gen,
- 12.7 das für den Lysin-Export kodierende lysE-Gen,
gleichzeitig verstärkt, insbesondere überexprimiert oder
30 amplifiziert.

13. Verfahren gemäß Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß man für die Herstellung von L-Lysin Bakterien
fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder
5 mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 13.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
codierende pck-Gen
- 13.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase
codierende pgi-Gen
- 10 14. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden
Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium*
glutamicum einsetzt.
- 15 15. Verwendung von Polynukleotidsequenzen gemäß Anspruch 1
als Primer zur Herstellung der DNA von Genen, die für
die für die Phosphofructokinase codieren, durch die
Polymerase-Kettenreaktion.
16. Verwendung von Polynukleotidsequenzen gemäß Anspruch 1
20 als Hybridisierungssonden.

Neue für das pfkA-Gen codierende Nukleotidsequenzen**Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid,
5 enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der
Gruppe

a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist
mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid
codiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2
10 enthält,

b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das
eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens
70 % identisch ist mit der Aminosäuresequenz von
SEQ ID No. 2,

15 c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den
Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz
von a), b) oder c),

20 Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren
unter Verstärkung des pfkA-Gens und die Verwendung als
Primer oder Hybridisierungssonde.